

# Host cell entry of vesicular stomatitis virus

**Doctoral Thesis****Author(s):**

Jóhannsdóttir, Hrefna Kristín

**Publication date:**

2008

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005692740>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

# Host cell entry of vesicular stomatitis virus

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Sciences

Presented by

Hrefna Kristín Jóhannsdóttir

M.Sc. Biomedical Science from the University of Iceland  
Born on 12<sup>th</sup> of September 1974  
Citizen of Iceland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ari Helenius, examiner  
Prof. Dr. Urs Greber, co-examiner  
Prof. Dr. Daniel Gerlich, co-examiner

2008



## 1 SUMMARY

VSV has for many years been considered to be an example of a classical cargo of the clathrin-mediated endocytic pathway and both the virus itself as well as its Transmembrane glycoprotein have been used extensively in various studies as control cargo, virus or transmembrane protein. Clathrin-mediated endocytosis is one of the most extensively investigated entry portals of the cell. Until recently, it has been regarded as a uniform identity, strictly based on certain key components for its maintenance, irrespective of cell-type or cargo involved. Accumulating evidence however suggest that the defining core components of clathrin-mediated pathways might be limited to the clathrin-coat itself and the large GTPase, dynamin, which seem to be indispensable for clathrin-based pathways while other factors such as adaptor proteins, accessory factors, actin cytoskeleton, kinases, and phosphatases might be more cargo specific than previously thought. It thus becomes important to investigate in a cargo oriented way the requirements for CME to be able to define with more specificity different subsets of the pathway.

Our aim in the current study was to have a closer look at the entry of VSV into tissue culture cells in respect to morphology, kinetics, and cell factor dependence. Using transmission electron microscopy we performed morphological studies of the virus interaction with the plasma membrane and in endocytic and endosomal compartments. Using live-cell imaging by TIRF-FM, we visualized the interactions between the virus and components of the clathrin-coated pits. Inhibitor studies, dominant negative proteins and siRNA-mediated knockdown in combination with entry, infection and fusion assays were used to define more closely the entry kinetics as well as cellular factors involved in VSV infection.

Our results show that the virus associates with clathrin-coated pits, upon binding to the plasma membrane. It is internalized very rapidly, primarily by inducing the formation or stabilization of coated pits, and is subsequently seen

in clathrin-coated vesicles. The virus is targeted to endosomes where lowered pH induces acid-activation of the viral envelope with membranes of the endocytic compartments, eventually resulting in nucleocapsid release into the cytosol where replication takes place. Acid-exposure and the acid-activated change in the virus needed for penetration occurs with 2-10 min after endocytosis. After that, the fraction of viruses that are able to penetrate decreases, and 1h later, no infection can be detected, indicating that the virus is no longer in a fusion/penetration compatible state and/or compartment. Perturbation studies confirmed the clathrin-dependency of the virus but also left open the possibility that VSV can use a subset of CCPs for productive entry as well as non clathrin-mediated pathways.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Der Transport von VSV durch die Zellmembran, wird seit mehreren Jahren als Beispiel für die klassische Clathrin-vermittelten Endozytose verwendet und das Virus als solches, wie auch seine Transmembranproteine wurden in vielen Studien als Kontrollgut benutzt. Clathrin-vermittelte Endozytose ist der bis heute am besten untersuchte Aufnahmeweg in die Zelle. Bis vor Kurzem wurde dieser Weg als einheitlich betrachtet und durch Schlüsselkomponenten der eigenen Aufrechterhaltung beschrieben, ungeachtet des Zelltyps in der die Beobachtungen gemacht wurden oder des zu transportierenden Materials. Sich ansammelnde Beweise deuten darauf hin, dass die Kernkomponenten der Clathrin-vermittelten Endozytose die Clathrin Hülle selbst und die GTPase Dynasore sind, beide unerlässlich für eine einwandfrei funktionierende Aufnahme. Im Gegensatz dazu, könnte der Transport andere Güter wie Adaptorenproteine, Proteine des Aktin-Zytoskeletts, Kinasen und Phosphatasen spezifischer reguliert sein als bisher vermutet. Umso wichtiger wird es sein die Clathrin-vermittelten Endozytose mit Hilfe der zu transportierenden Proteinen zu durchleuchten, und dadurch spezifischere Unterteilungen des Eintrittsmechanismus zu definieren.

Das Ziel unserer Forschung bestand darin bezüglich der Morphologie, Kinetik und der Abhängigkeit von verschiedenen Zellfaktoren näher zu untersuchen, wie VSV in Zellen eindringt. Mit Hilfe eines Elektronenmikroskops haben wir morphologische Studien durchgeführt über die Interaktion des Virus mit der Plasmamembran und in endozytischen und endosomalen Kompartimenten. Unter Verwendung von lebenden Gewebeskulturzellen und mit Hilfe von TIRF-FM haben wir die Interaktionen zwischen dem Virus und den Komponenten der Clathrin-markierten Vesikeln (CCPs) visualisiert. Inhibitor-Studien, dominant negative Proteine und siRNA-vermitteltes ‚Knockdown‘ in Kombination mit Infektions- und Fusionsassays wurden benutzt, um sowohl die Eintrittskinetik als auch die beteiligten zellulären Faktoren der VSV Infektion näher zu definieren.

Gemäss unseren Resultaten bindet das Virus an die Plasmamembran und assoziiert dadurch mit den CCPs. Es induziert eine sehr rasche Internalisierung, vor allem, indem es die Bildung oder Stabilisierung von den CCPs bewirkt. Als Folge wird es in Clathrin bedeckten Vesikeln internalisiert. Das Virus zielt auf Endosome mit tiefem pH, die eine säure-aktivierte Fusion der viralen Aussenhülle mit der Membrane des endozytischen Kompartiments auslösen die schlussendlich in die Freisetzung des Nucleocapsids in das Zytosol resultiert, wo schliesslich die Replikation stattfindet. Die säure-induzierte Freilegung und die für die Penetration notwendigen Veränderungen im Virus finden 2-10 Minuten nach Endozytose statt. Danach nimmt die penetrationsfähige Anzahl der Viren ab; 1h später kann keine Infektion entdeckt werden, was zeigt, dass der Virus sich nicht mehr in einem fusions-/penetrationskompatiblen Zustand und/oder Kompartiment befindet. Induzierte Störungen, die gezielt während Studien getestet wurden bestätigen die Clathrin-Abhängigkeit des Virus, lassen jedoch auch die Möglichkeit bestehen, dass VSV eine Untergruppe von CCPs für das produktive Eindringen sowie auch als non Clathrin-vermittelte Endocytosewege verwenden kann.